

ÉVALUATION CLINIQUE DE LA FONCTION DU THYMUS

E. CASTERMANS (1), G. MORRHAYE (1), S. MARCHAND (2), H. MARTENS (3), M. MOUTSCHEN (4),
F. BARON (5), Y. BEGUIN (6), V. GEENEN (7)

RÉSUMÉ : Le thymus est le seul organe responsable de la mise en place d'un répertoire diversifié de lymphocytes T tolérants vis-à-vis du soi et compétents vis-à-vis du non soi, de même que de la génération de cellules T régulatrices spécifiques d'antigènes du soi. La fonction thymique peut être indirectement appréciée par les techniques d'imagerie médicale (tomodensitométrie/CT-scan, imagerie par résonance magnétique/IRM, et tomographie par émission de positons/PET-scan). Le phénotypage des cellules T circulant en périphérie et la numération des cellules T naïves (CD45RA) permettent une première estimation de la génération intra-thymique de lymphocytes T. Enfin, la thymopoïèse est aujourd'hui mieux évaluée grâce à la quantification par PCR des cercles d'excision (TREC) générés au cours du réarrangement intra-thymique des segments de gène codant pour les parties variables des chaînes du récepteur T à l'antigène (TCR). Cette technique est très fiable dans les circonstances où il n'existe pas de prolifération ou d'apoptose intenses des lymphocytes T périphériques.

MOTS-CLÉ : *Thymus - Thymopoïèse - Différenciation T*

CLINICAL EVALUATION OF THYMIC FUNCTION

SUMMARY : The essential role of the thymus is to install an extremely diverse repertoire of T lymphocytes that are self-tolerant and competent against non-self, as well as to generate self-antigen specific regulatory T cells (Treg) able to inactivate in periphery self-reactive T cells having escaped the thymic censorship. Although indirect, techniques of medical imaging and phenotyping of peripheral T cells may help in the investigation of thymic function. Nowadays however, thymopoiesis is better evaluated through quantification by PCR of T-cell receptor excision circles (TREC) generated by intrathymic random recombination of the gene segments coding for the variable parts of the T-cell receptor for antigen (TCR). The TREC methodology is very valuable in the circumstances not associated with intense proliferation or apoptosis of peripheral T lymphocytes.

KEYWORDS : *Thymus - Thymopoiesis - T-cell differentiation*

INTRODUCTION

Les défenses immunitaires de l'homme s'organisent en deux grands systèmes : le système immunitaire inné ou immunité naturelle dont les acteurs sont les monocytes/macrophages, les polynucléaires, les cellules dendritiques (DC) et les cellules tueuses naturelles (NK), et le système immunitaire acquis ou adaptatif (lymphocytes B et T). Ce dernier possède quatre propriétés fondamentales : diversité, spécificité, mémoire et tolérance vis-à-vis du soi. En effet, les lymphocytes B et T réagissent à un antigène précis (spécificité), ont le potentiel de reconnaître un nombre important d'antigènes (diversité), et gardent en mémoire les caractéristiques des antigènes rencontrés. De plus, à l'exception de circonstances pathologiques (maladies auto-immunes), les cellules T et B ne sont pas activées par les antigènes du soi (tolérance). Les lympho-

cytes B issus de la moelle osseuse sont les vecteurs de l'immunité humorale et produisent des immunoglobulines le plus souvent dirigées vers des déterminants antigéniques conformationnels. L'immunité cellulaire est assurée par les lymphocytes T issus de la différenciation dans le thymus de précurseurs T provenant d'abord du foie fœtal, puis de la moelle osseuse. Une coopération étroite existe entre réponses humorale et cellulaire puisque l'aide des cellules T est nécessaire à l'activité des cellules B, tandis que les lymphocytes B sont capables de présenter des épitopes antigéniques aux lymphocytes T.

PHYSIOLOGIE GÉNÉRALE DU THYMUS (1-5)

Le thymus est apparu au cours de l'évolution peu de temps après ou presque en même temps que l'émergence de la réponse immunitaire acquise. Il est l'unique organe lymphoïde responsable de la génération de cellules T (thymopoïèse) à la fois compétentes vis-à-vis des antigènes infectieux (non soi) et tolérantes vis-à-vis des antigènes du soi. Son rôle fondamental dans l'installation de la tolérance centrale au soi comprend, d'une part, la délétion des clones T réactifs au soi générés au cours de la recombinaison aléatoire des segments de gènes codant pour les parties variables du récepteur T à l'antigène (TCR) et, d'autre part, la génération de cellules T régulatrices (Treg) spécifiques d'antigènes du soi exprimés dans le thymus. La puissance tolérogène du thymus s'illustre par le fait que, parmi 100 précurseurs T ayant migré dans

(1) Doctorant en Sciences biomédicales, CHU Sart Tilman, Liège.

(2) Etudiante en Médecine Université de Liège.

(3) Chargé de Recherches, DGTR/Région Wallonne, Liège.

(4) Chef de Service, Service de Médecine Interne, Immunodéficiences et Maladies Infectieuses, CHU Sart Tilman, Liège.

(5) Chercheur Qualifié, (6) Directeur de Recherches, FNRS, Service d'Hématologie, CHU Sart Tilman, Liège.

(7) Directeur de Recherches, FNRS, Professeur d'Embryologie, Centre d'Immunologie ULg (CIL), Liège.

le thymus, seulement 2 à 5 cellules T matures naïves, à la fois compétentes et tolérantes, seront exportées en périphérie. Le nombre total de spécificités de TCR pour différents antigènes chez un individu est appelé le répertoire T. Ce répertoire périphérique possède deux caractéristiques majeures. D'une part, la reconnaissance d'un antigène du non soi (infectieux ou tumoral) par un lymphocyte T est restreinte par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ceci signifie que chaque cellule T ne réagit à un antigène que si, et seulement si, ce dernier est présenté par une molécule du CMH du soi (CMH de classe I ou CMH-I pour les cellules T CD8+, CMH de classe II ou CMH-II pour les cellules T CD4+). D'autre part, le répertoire T est essentiellement tolérant au soi : dans leur grande majorité, les cellules T de chaque individu sont incapables de répondre à un antigène du soi présenté par le CMH de cet individu.

La différenciation des lymphocytes T dans le thymus comprend plusieurs étapes :

1. La migration dans le thymus des précurseurs T originaires du foie fœtal puis de la moelle osseuse est guidée par l'intervention de certaines chimiokines, facteurs chimio-attractants qui ne seront pas détaillés ici.
2. Les précurseurs T pénètrent dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire, puis gagnent immédiatement la zone corticale externe sous-capsulaire où ils prolifèrent intensément pour former des lymphoblastes T.
3. Au cours de leur trajet du cortex vers la médullaire et au contact des cellules du parenchyme thymique (cellules épithéliales thymiques [CET] du cortex et de la médullaire, de même que macrophages et DC de la jonction cortico-médullaire et de la médullaire), les lymphoblastes T expriment des marqueurs membranaires de différenciation (CD) comme CD4 et CD8, et réarrangent au hasard les segments de gènes codant pour les chaînes du TCR.
4. Sélection négative des cellules T. La recombinaison génétique aléatoire est responsable de la génération de TCR possédant une affinité élevée pour certains antigènes du soi présentés par les protéines thymiques du CMH-I et du CMH-II. Sont alors éliminées par apoptose les cellules CD4 exprimant un TCR de haute affinité pour les antigènes du soi présentés par le CMH-II, et les cellules CD8 portant un TCR de haute affinité pour les antigènes présentés par le CMH-I.

1° Techniques d'imagerie médicale; 2° Analyse par cytométrie en flux (FACS) des phénotypes (CD) des lymphocytes T ; et 3° Mesure par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (Q-PCR) du taux des cercles d'excision du TCR (TREC) produits dans les lymphocytes T sanguins.

TECHNIQUES D'IMAGERIE MÉDICALE

Par tomodensitométrie (CT-scan) et par IRM, un indice de volume thymique peut être déterminé sur une échelle de 0 à 5, à partir de coupes de 5 mm obtenues en fin d'expiration le long de la hauteur sternale : 0 – absence de tissu thymique entièrement remplacé par du tissu adipeux; 1 – tissu thymique minimal, difficilement identifiable; 2 – tissu thymique minimal; 3 – tissu thymique de volume modéré; 4 – thymus de grand volume; et 5 – «masse» thymique avec suspicion d'hyperplasie ou de thymome.

La densitométrie à émission de positons (PET-Scan) se révèle aussi très utile dans les



Figure 1 : Visualisation des deux lobes thymiques par tomographie à émission de positons chez une patiente présentant une récurrence de leucémie lymphoïde aiguë

ÉVALUATION DE LA FONCTION THYMIQUE

Trois techniques permettent aujourd'hui une évaluation clinique de la fonction du thymus :

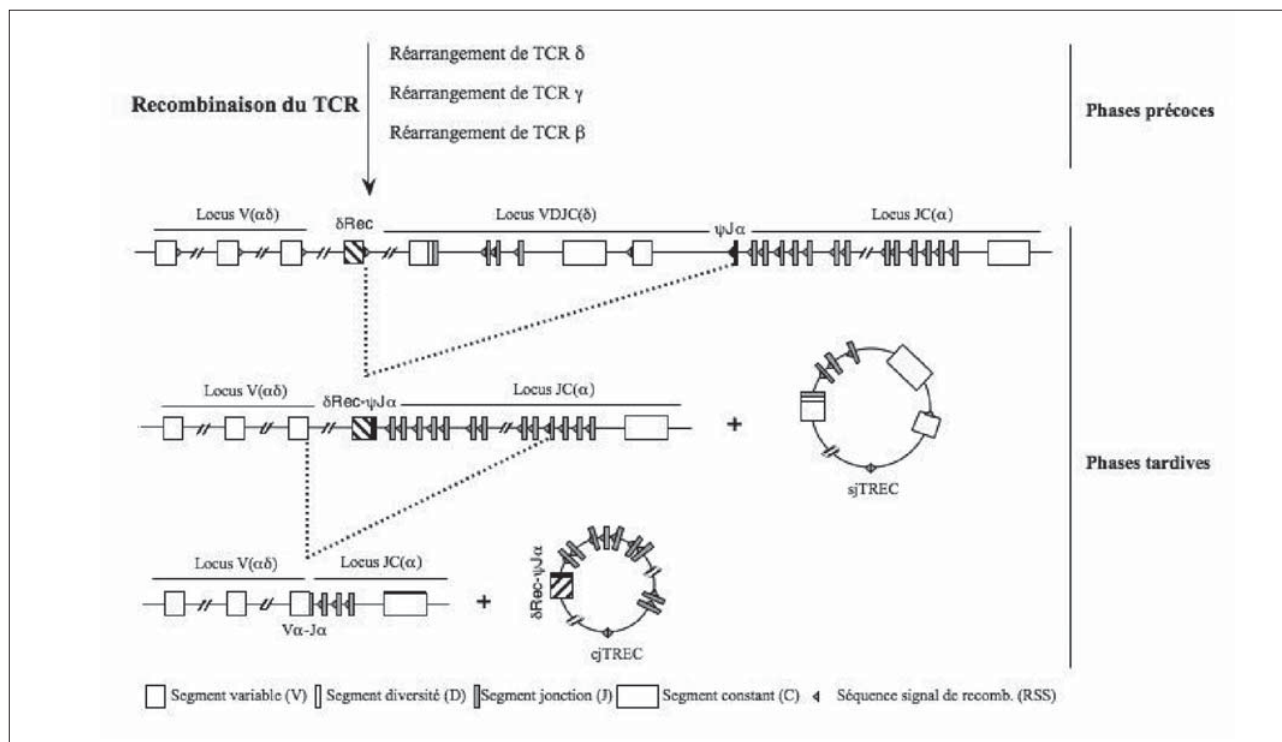


Figure 2 : Formation des cercles d'excision du TCR (sjTREC et cjTREC) au cours des phases tardives de la recombinaison des segments géniques du TCR dans le thymus.

syndromes lymphoprolifératifs impliquant le compartiment lymphoïde du thymus (Fig. 1).

PHÉNOTYPAGE DES LYMPHOCYTES T NAÏFS

Le marqueur CD45 identifie une tyrosine phosphatase membranaire pouvant exister sous plusieurs isoformes de poids moléculaires différents. Les cellules T 'naïves' CD4 ou CD8 qui n'ont jamais rencontré d'antigène en périphérie expriment les marqueurs de membranes CD45RA et CD62L, tandis que les cellules CD4+ ou CD8+ effectrices/mémoires sont CD45RO+ et CD62L négatives. Il est communément admis que le pourcentage de cellules T naïves est très proche de celui des cellules T ayant quitté récemment le thymus. Par cytométrie en flux (FACS), il est donc possible d'obtenir une première évaluation du pourcentage des émigrants T thymiques récents (RTE) dans la population T périphérique en déterminant le pourcentage des cellules T possédant le phénotype suivant : CD3+, CD4+ (ou CD8+), CD45RA+, CD62L+, et CD45RO négatif.

QUANTIFICATION DES CERCLES D'EXCISION DES TCR (TREC) (6, 7)

Les TCR sont des protéines dimères qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et qui sont codées par quatre gènes différents (α ,

β , γ et δ). Nonante-cinq pour cent des cellules T périphériques expriment un TCR de type $\alpha\beta$, tandis que 5% environ expriment un TCR de type $\gamma\delta$. Ces quatre gènes sont à la base de l'énorme diversité des lymphocytes T. Cette diversité est générée au cours de leur différenciation dans le thymus. La partie variable amino-terminale des TCR, responsable de la reconnaissance de l'antigène, est codée par une combinaison des segments géniques «variable (V)», «diversité (D)» et «jonction (J)» pour les chaînes β et δ , et par une combinaison des segments V et J pour les chaînes α et γ . Un quatrième segment «constant (C)» encode les domaines constants du TCR.

La recombinaison des segments géniques encodant la partie variable des TCR, à l'origine de la diversité du répertoire des cellules T, se produit essentiellement dans le thymus et est catalysée par l'action de deux enzymes, les recombinaisons 1 et 2 (RAG-1 et RAG-2). Il s'agit d'un processus complexe représenté à la figure 2 et dont la description précise sort du cadre de cette revue. En résumé, ce processus engendre l'excision de fragments d'ADN qui vont former deux types de cercles situés en dehors des chromosomes (épisomes). On distingue ainsi deux types de cercles d'excision de réarrangement des TCR (TREC) : le signal-joint (sj) TREC et le coding-joint (cj) TREC (Fig. 2). Ces TREC sont présents dans les lymphocytes T matures

qui quittent le thymus et ne seront pas dupliqués lors des divisions cellulaires ultérieures puisqu'ils sont en dehors de l'appareil chromosomique. Ils seront donc présents dans un seul des deux lymphocytes T résultant de la mitose. Par réaction de polymérase en chaîne quantitative (Q-PCR) et en utilisant des amorces spécifiques, il est possible de mesurer la quantité des TREC dans un prélèvement sanguin et de l'exprimer par rapport à un nombre de 100.000 lymphocytes T circulants. On considère que la mesure des sjTREC en périphérie est un biomarqueur fiable de la thymopoïèse. Cependant, en cas d'apoptose ou d'expansion périphérique des lymphocytes T matures (comme par exemple dans le SIDA ou après greffe de cellules souches hématopoïétiques), des taux peu élevés de sjTREC sont mesurés malgré une activité thymique normale.

Une limitation à l'estimation de l'activité thymique par la quantification des TREC est que, puisque les TREC ne sont pas répliqués lors de la mitose, des taux de TREC bas peuvent être dus, tant à une activité thymique faible qu'à une expansion périphérique importante des lymphocytes T, conduisant à une «dilution» des TREC (8). Ceci est particulièrement gênant dans le cadre des infections systémiques pouvant conduire à une prolifération très importante de lymphocytes T périphériques. Une équipe canadienne propose dès lors, d'estimer l'activité thymique, en calculant le rapport entre les sjTREC (produits tardivement lors de la maturation thymique) et les TRECB β (produits précocement lors de la maturation thymique) (9). Le rapport sjTREC/TRECB β constitue ainsi une mesure directe du nombre de divisions intrathymiques des lymphocytes T, et est «fixé» une fois que les lymphocytes T ont quitté le thymus (9).

CONCLUSION

Pendant longtemps, le thymus est resté une «boîte noire», considérée comme inaccessible à l'exploration clinique, et cette notion d'inaccessibilité, était renforcée par la conception très erronée selon laquelle le thymus n'exercerait plus d'activité significative au-delà de la puberté. Outre les techniques indirectes d'imagerie médicale et de phénotypage lymphocytaire, l'arsenal de la biologie médicale s'est renforcé depuis peu, grâce à l'apport d'une technique permettant d'évaluer la thymopoïèse par la quantification des TREC. Dans un second article (10), nous montrerons comment cette nouvelle technique de biologie médicale a permis de mieux com-

prendre l'intervention du thymus dans diverses conditions cliniques.

REMERCIEMENTS

Ces travaux sont soutenus en partie par le FNRS et par la Région wallonne (DGTRE, projet Réseaux 2 SENEGENE).

BIBLIOGRAPHIE

1. von Boehmer H, Aifantis I, Goumani F, et al.— Thymic selection revisited : how essential is it ? *Immunol Rev*, 2003, **191**, 62-78.
2. Kyewski B, Klein L.— A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol*, 2006, **24**, 571-606.
3. Huseby ES, White J, Crawford F, et al.— How the T-cell repertoire becomes peptide and MHC specific ? *Cell*, 2005, **122**, 247-260.
4. Martens H, Goxe B, Geenen V.— The thymic repertoire of neuroendocrine self-antigens: physiological implications in T-cell life and death. *Immunol Today*, 1996, **7**, 312-317.
5. Heddon B, Mason D.— The third function of the thymus. *Immunol Today*, 2000, **21**, 95-99.
6. Douek DC, Mc Farland RD, Keiser PH, et al.— Changes in thymic function with age and during treatment of HIV infection. *Nature*, 1998, **396**, 690-695.
7. Poulin JF, Viswanathan MN, Harris JM, et al.— Direct evidence for thymic function in adult humans. *J Exp Med*, 1999, **190**, 479-486.
8. Hazenberg MD, Otto SA, de Pauw ES, et al.— T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events. *Blood*, 2002, **99**, 3449-3453.
9. Dion ML, Poulin JF, Bordi R, et al.— HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity*, 2004, **21**, 757-768.
10. Castermans E, Marchand S, Morrhay G, et al.— Applications cliniques de la mesure de la thymopoïèse. *Rev Méd Liège*, 2007, **62**, n°12, sous presse.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Pr. V. Geenen, Centre d'Immunologie, ULg (CIL), CHU Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.